



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Efecto de *Manvert-Silikon* na protección do tomate fronte ó
alumnio.**

**Efecto del Manvert-Silikon en la protección del tomate frente al
aluminio.**

Manvert-Silikon's effect on tomato protection from aluminium

Guillermo Pérez Fernández

Julio, 2016

Cristina Silvar Pereiro, Alba García Ulloa

ÍNDICE

Resumen	2
1. Introducción	3
i) La planta del tomate	3
ii) El Aluminio	3
iii) Productos fitofortificantes	4
iv) <i>Manvert-Silikon</i>	5
2. Objetivos	6
3. Material y métodos	7
i) Plantas utilizadas durante el ensayo	7
ii) Tratamiento realizado	7
iii) Determinación del peso fresco y seco de las plantas	8
iv) Análisis de paredes celulares de raíz mediante FT-IR	8
v) Medida de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.	9
vi) Procesamiento estadístico de los datos	9
4. Resultados y discusión	10
i) Crecimiento vegetativo	10
ii) Medida de la expresión génica por PCR a tiempo real	14
iii) Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR)	15
5. Conclusiones	19
6. Bibliografía	20

RESUMEN

El aluminio es un metal muy frecuente en la mayoría de los suelos que se utilizan para el cultivo. En algunos casos produce efectos tóxicos sobre las plantas cultivadas y disminuye el rendimiento de la cosecha. En este ensayo se testó el efecto del fitofortificante *Manvert-Silikon* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en presencia de aluminio para comprobar si minimiza el efecto nocivo de este compuesto. Los resultados obtenidos de biomasa nos confieren que no hay diferencias significativas entre grupos ante los diversos tratamientos y en el estudio de expresión génica del gen LHA observamos que se produce una mayor expresión del gen en plantas tratadas con *Manvert-Silikon* en solución. Por último la técnica de FT-IR nos demuestra que en presencia del producto, hay variaciones en las proporciones de los componentes de la pared celular de las raíces en los distintos tratamientos.

ABSTRACT

Aluminium is a very common metal used in most cultivation soils. Sometimes, this metal cause toxic effects on crop plants and reduces crop yields. In this test we check the effect of fitofortificant *Manvert-Silikon* in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. 1753) with aluminium presence to see if this minimizes the harmful effect of this compound. The biomass results obtained proves that there are no significant differences between groups. Besides, in the study of gene expression LHA we observe an increase on the plant gen expression that were under the *Manvert-Silikon* solution. Finally, the FT-IR technique proves that in presence of the product, there are variations in proportions on the the components of the root's cell wall in the different treatments.

1. INTRODUCCIÓN

i) LA PLANTA DEL TOMATE

Solanum lycopersicum (L.1753) comúnmente conocido como tomate es una especie perteneciente a la familia de las solanáceas proveniente de Centro y Sudamérica.

Herbácea de porte muy diverso debido a que hay una gran diversidad de variedades pero frecuentemente con un porte grande. Poseen tallos con pelos blanquecinos y cortos y hojas ovaladas o lanceoladas.

Poseen inflorescencias cimosas aisladas con un número variable de flores actinomorfas y hermafroditas.

Fruto con forma esférica o alargada con una tonalidad roja cuando se encuentra maduro y con una gran cantidad de semillas en su interior.

Los pueblos azteca y maya fueron los primeros en introducir el tomate en su dieta alimentaria. Posteriormente, los españoles lo distribuyeron por todas sus colonias y lo trajeron a la península, por lo que se expandió considerablemente.

A lo largo de los siglos, se ha ido conociendo los beneficios que aporta dicho fruto en la alimentación ya que contiene una gran cantidad de vitaminas además de poseer pocas calorías y grasas. Además es rica en minerales tales como el potasio, fosforo, magnesio y calcio.

A día de hoy, el tomate abarca una gran superficie cultivada y se exporta a numerosos países de todo el mundo.

ii) EL ALUMINIO

El aluminio es un elemento químico (Al) y su número atómico es el 13. Constituye el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre y se presenta en una gran cantidad de suelos cultivables de todo el mundo (Kopittke et al., 2015).

El aluminio es muy perjudicial tanto para la fauna como para la flora y cuando el pH alcanza valores menores a 5.5 se libera ion Aluminio Al^{3+} que es altamente fitotóxico. y se considera el responsable de la disminución del rendimiento en los cultivos (Zheng et al., 2014).

Como puede verse en el ejemplo de la figura 1 produce efectos directos en las raíces tales como la reducción de su desarrollo, engrosamiento radicular, inhibición de crecimiento de raíces adventicias, y el hecho de tornarse más oscuras. En hojas también se evidencia la toxicidad del aluminio por un lento desarrollo, clorosis temprana y aparición de manchas de color café que avanzan desde los bordes y provocan la formación de muescas. Las hojas se pueden doblarse a la mitad o directamente marchitarse si la exposición al elemento es prolongada.



Fig. 1 Efecto del aluminio en las raíces en plantas de arroz.

<http://www.scielo.org.mx/img/revistas/rfm/v33n1/a7f2.jpg>

La membrana plasmática y el apoplasto de las células radiculares representan una barrera para la toma de aluminio pero puede irse acumulando en el apoplasto así que con el tiempo resultaría igualmente perjudicial la presencia de este ion en el suelo.

Los efectos de toxicidad por el Al^{3+} son más evidentes en los ápices radiculares debido a que su permeabilidad celular es mayor que en otras zonas de la raíz (Wagatsuma *et al.* 1987).

Muchos ácidos orgánicos segregados por las raíces de los vegetales están implicados en la reducción de la toxicidad por aluminio y en la tolerancia de las plantas al elemento (Ma, 2000) como pueden ser el citrato, oxalato, tartarato, malonato y lactato (Casierra F. 2007). Algunas plantas poseen mecanismos de producción de ácidos orgánicos mediados por ATPasas para reducir la toxicidad de aluminio. (Delhaize *et al.*, 1993) como es el caso de la planta del tomate.

La LHA es un H^+ - ATPasa que se expresa en las membranas citoplasmática de las raíces y posee funciones energéticas y reguladoras.

iii) PRODUCTOS FITOFORTIFICANTES

Un producto fitofortificante es aquel que favorece que los cultivos se desarrollen con mayor vigor, produzcan mayor producción o protección frente a patógenos y condiciones adversas (Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental, 2012)

Uno de los efecto de los fitofortificantes es el de estimular los mecanismos de defensa de la planta o bien por competencia por los organismos patógenos.

Para el uso de los fitofortificantes es necesario que se cumplan las legislaciones que a continuación se exponen:

- i) Orden APA/1470/2007 de 24 de mayo por la que regula la comunicación de Comercialización de determinados medios de defensa fitosanitaria.

ii) Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.

iv) MANVERT-SILIKON



Fig2. Detalle del etiquetado del producto *Manvert-Silikon*

Manvert-Silikon es un producto fabricado por la empresa española Biovert S.A. y está indicado como inductor de autodefensa y un uso recomendado para:

- i) Favorecimiento del desarrollo radicular de las plantas y mejora la adaptabilidad de éstas al medio. Protección frente a periodos de estrés y potenciamiento de su desarrollo y crecimiento.
- ii) Mejora de la absorción de fósforo (P) y de hierro (Fe) presentes en el suelo, para incrementar la productividad y calidad de las cosechas agrícolas
- iii) Protección de las plantas contra el ataque de microorganismos patógenos, ya que fortalece mecánica y bioquímicamente los tejidos de la planta.

La empresa afirma que el productos e puede utilizar de manera preventiva ante ataque de microorganismos patógenos, insectos y estrés abiótico.

El producto se compone de Óxido de sílice (Ácido orto silícico H_4SiO_4). El silicio tiene un efecto positivo en las plantas en contacto con metales pesados por su interacción con ellos produciendo una barrera física y evitando que penetren los metales pesados, o bien relacionado con regulaciones metabólicas en el interior de la planta.

2. OBJETIVOS

- i) Análisis del crecimiento vegetativo de plantas tratadas con Manvert-Silikon en presencia /ausencia de aluminio.
- ii) Valorar la capacidad del Manvert-Silikon de inducir expresión de genes relacionados con la respuesta al aluminio.
- iii) Estudiar los cambios en las paredes celulares de raíces ante los distintos tratamientos usando espectroscopía de infrarrojos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

i) Plantas utilizadas durante el ensayo.

Se ha elegido la planta del tomate *Solanum lycopersicum* (L) para la realización del ensayo.

Se usaron semillas de tomate de la variedad San Pedro y se dejaron germinar en semilleros de plástico rellenos de vermiculita en los que se introdujeron 8 semillas de la planta por pocillo.

Se regó con agua destilada y se mantuvieron en la cámara de crecimiento con unos parámetros de 16 h de luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura de 25 °C durante las horas de luz y 18 °C durante las fases de oscuridad.

Tras la germinación, las plántulas se mantuvieron con los mismos parámetros en la cámara y fueron regadas cada dos días con una solución nutritiva que aportase sus necesidades nutricionales en macro, micro y oligoelementos.

ii) Tratamiento realizado

Tras el desarrollo de las plántulas en la cámara de crecimiento, tras 15 días se extrajeron de los semilleros 144 plantas procurando que tuvieran tamaños homogéneos. De estas 144 plantas, se repartieron en dos grupos a razón de 72 plantas por grupo.

En cada grupo se testará el efecto del *Manvert-Silikon* de manera diferente y así en el primero se aplicará el tratamiento (*Manvert-Silikon*) mediante pulverización foliar y en el segundo, en disolución.

Para el ensayo del primer tratamiento, pulverización foliar, se repartieron las 72 plantas en dos vasos de precipitados con agua destilada. A las plantas situadas en el primer vaso de precipitados se les aplicó 100 ml de agua destilada a modo de control y al segundo vaso de precipitados se aplicó una disolución de agua destilada y *Manvert-Silikon* a una concentración de 3 mL/L. Tras la aplicación se dejaron pasar seis horas para permitir la absorción de los tratamientos.

A continuación se preparó dos gradillas de tubos de 50 mL y se separaron las plantas en las que se aplicó el tratamiento mediante pulverización y solución. En cada tubo de 50 mL se introdujeron tres plantas procurando que todas tuvieran el mismo tamaño.

En la gradilla correspondiente al tratamiento en solución se repartieron las plantas en función del contenido del tubo: Agua destilada, *Manvert-Silikon* (3mL/L), AlCl_3 (500 μM) y *Manvert-Silikon* + AlCl_3 .

Así todas las plantas se mantuvieron en la cámara de crecimiento un total de 15 días y bajo las mismas condiciones ambientales y de solución en dos gradillas.

Tabla 1: Distribución de los tubos con sus respectivos tratamientos durante el crecimiento vegetativo de las plantas

	GRADILLA 1	GRADILLA 2
	Pulverización foliar	Directamente en solución
Tubo 1	H ₂ O + H ₂ O	H ₂ O
Tubo 2	H ₂ O + <i>Manvert-Silikon</i>	Disolución de AlCl_3 (3 mL/L)
Tubo 3	AlCl_3 + H ₂ O	Disolución AlCl_3 (500 μM)
Tubo 4	AlCl_3 + <i>Manvert-Silikon</i>	Disolución de AlCl_3 (500 μM) + <i>Manvert-Silikon</i> (3mL/L)

Tanto los datos de peso fresco como los de peso seco se tomaron con ayuda de una balanza de precisión. Los valores de peso seco fueron obtenidos tras depositar los distintos órganos de la planta sobre placas petrie en una estufa 48 h a una temperatura aproximada de 60°C para eliminar todo su contenido en agua.

iv) Análisis de paredes celulares de raíz mediante FT-IR

Para el desarrollo de esta técnica se tomaron las raíces de las plantas de los distintos tratamientos tras 15 días de crecimiento vegetativo en la cámara, se empaquetaron en sobres de papel de aluminio y se conservaron en el congelador a -80 °C.

Para conseguir aislar las paredes celulares de las raíces se machacaron las muestras con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo muy fino. Este polvo fino se resuspendió con agua destilada y la mezcla se pasó a tubos de centrifuga.

Se realizó una primera centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos y se deshecha el sobrenadante. Posteriormente se añadió Tritón X-100 1%, se centrifugó a 4.000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se repitió el lavado con Tritón X-100 1%.

A continuación se realizó un lavado con agua destilada (4.000 rpm y 15 minutos) y de nuevo desechamos el sobrenadante y conservamos el pellet.

Para finalizar se hicieron dos lavados con etanol 70% (4.000 rpm 15 minutos y otros dos con etanol 96%.

Una vez realizados todos los lavados se retira el sobrenadante y se introducen los tubos con el precipitado en una estufa a 37 °C para eliminar totalmente la humedad. Estas se mantuvieron guardados con desecante (silica-gel) para evitar que captasen humedad

Una vez extraídas las paredes celulares de las raíces de los distintos tratamientos procedemos a su empaquetado en tubos de 10 mL cerrados y guardados en una caja con silica-gel para procurar de todos modos que no entre nada de humedad las muestras.

Las muestras se llevaron al SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) donde con ayuda de un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR obtuvimos los espectros asociados a cada muestra (Fernández-Pérez *et al.* 2015)

El espectrómetro consta de un brazo móvil con un tornillo cuya función es la de apretar la muestra sobre el cristal de manera que un sensor recoge la información del haz de rayos infrarrojos que es emitida hacia la muestra.

Con ayuda del programa OPUS se realizó la corrección de la línea base y la posterior normalización de los datos. Con el software Excel se pudo filtrar las longitudes de onda deseadas y realizar un promedio de las mismas.

v) Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.

En esta parte del ensayo se intentó testar si el producto de interés promovía la expresión del gen LHA. Se testó en plantas que no estuvieron en presencia con el AlCl₃ para observar si en ausencia de este compuesto la planta por causa del Silikon producía una mayor expresión del gen.

El material se almacenó a -80 °C y se machacó en morteros autoclavados.

Mediante el kit de extracción de RNA Biorad Aurum™ y el protocolo facilitado se extrajo el RNA y se determinó la cantidad total del mismo empleando un Nanodrop ND-1000 ya

Para la conversión de RNA a cDNA se partió de 200 ng de RNA y se utilizó el kit First Strand cDNA Synthesis de Fermentas y se mandaron dos réplicas de cada muestra al SAI para la realización de una PCR a tiempo real para determinar la expresión del gen de interés en comparación con un gen de expresión constitutiva.

vi) Análisis estadístico de los datos

Con respecto al crecimiento vegetativo de las plantas del tomate ante los diferentes tratamientos, los datos de peso fresco y peso seco se promediaron mediante el software Excel. Con este programa se representó gráficamente las variaciones de biomasa de los distintos grupos de plantas y para el análisis de las varianzas, se realizaron test ANOVA en el software SPSS.

Se utilizó el análisis de la varianza o ANOVA para poder evaluar la importancia de varios factores al comparar las medias, en este caso de peso fresco y peso seco de todas las réplicas

En el procesamiento de los datos en la técnica de FTIR se empleó el OPUS para hacer una corrección de línea base y se normalizaron los espectros conjuntamente. También se utilizó Excel para promediar los valores de las longitudes de onda. Por otro lado, se usó el SPSS para realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras 15 días en la cámara de crecimiento, se extrajeron las plantas de los tubos y se secaron con papel de filtro las raíces.

Se puede observar claramente como las plantas tratadas con $AlCl_3$ tenían raíces con un desarrollo desfavorable y carecían de raíces adventicias debido al efecto negativo del aluminio. Por otra parte podemos observar cierto grado de clorosis en las hojas de todas las plantas debido a la ausencia de nutrientes en el medio.

Se realizó el peso fresco de los distintos órganos y tras el secado a las 72 h a $60^\circ C$ se tomaron los datos de peso seco.

Dado que tenemos p-valores > 0.05 no se puede rechazar la hipótesis que afirma que hay diferencias significativas entre los grupos a diferentes tratamientos.

i) CRECIMIENTO VEGETATIVO

Pulverización foliar

Tabla 2: Resultados de las ANOVA en las hojas de las plantas tratadas mediante pulverización

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	,092	3	,031	,285	,836
	Within Groups	2,149	20	,107		
	Total	2,240	23			
Ps	Between Groups	,000	3	,000	,002	1,000
	Within Groups	,063	20	,003		
	Total	,063	23			

Tabla 3: Resultados de las ANOVA en las hojas de las plantas tratadas mediante pulverización

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	,284	3	,095	,548	,655
	Within Groups	3,454	20	,173		
	Total	3,738	23			
Ps	Between Groups	,008	3	,003	,669	,581
	Within Groups	,079	20	,004		
	Total	,087	23			

Tabla 4: Resultados de las ANOVA en las hojas de las plantas tratadas mediante pulverización

		Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	,227	3	,076	,835	,491
	Within Groups	1,813	20	,091		
	Total	2,040	23			
Ps	Between Groups	,003	3	,001	,510	,680
	Within Groups	,037	20	,002		
	Total	,040	23			

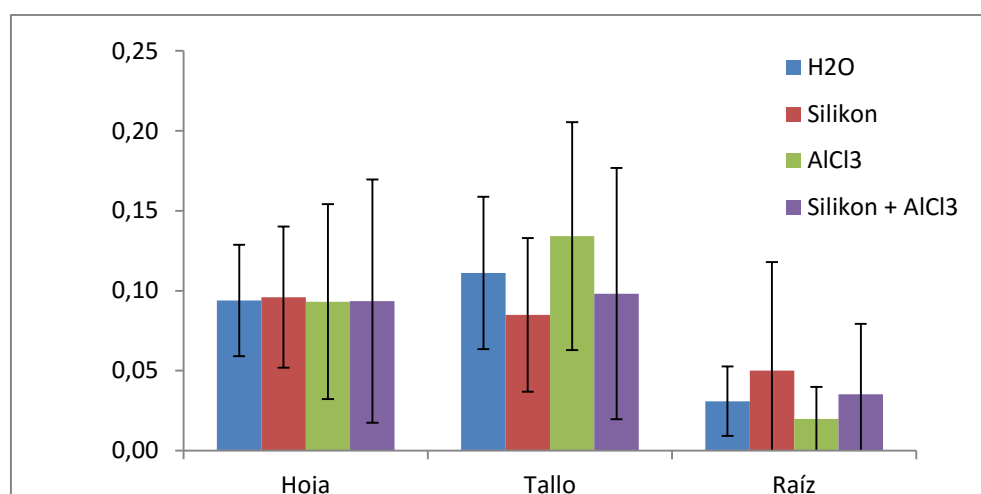


Fig. 3 Peso fresco de las diferentes partes de las plantas de tomate tratadas con *Malvert-Silikon* pulverizado

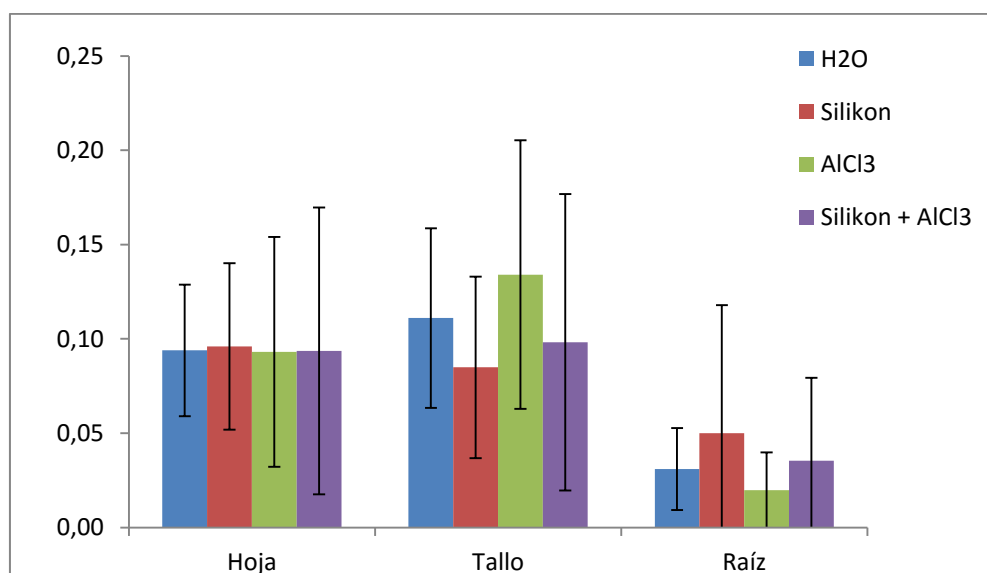


Fig. 4: Peso seco de las diferentes partes de las plantas de tomate tratadas con *Malvert-Silikon* pulverizado

Aplicación en solución

Tabla 5: Resultados de las ANOVA en las hojas de las plantas en solución

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	,334	3	,111	,520	,674
	Within Groups	4,286	20	,214		
	Total	4,620	23			
Ps	Between Groups	,012	3	,004	,783	,517
	Within Groups	,105	20	,005		
	Total	,117	23			

Tabla 6: Resultados de las ANOVA en los tallos de las plantas tratadas en solución

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	1,843	3	,614	,686	,571
	Within Groups	17,896	20	,895		
	Total	19,739	23			
Ps	Between Groups	,015	3	,005	,418	,742
	Within Groups	,245	20	,012		
	Total	,261	23			

Tabla 7: Resultados de las ANOVA en las raíces de las plantas tratadas en solución

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pf	Between Groups	,292	3	,097	1,086	,378
	Within Groups	1,792	20	,090		
	Total	2,084	23			
Ps	Between Groups	,001	3	,000	,727	,548
	Within Groups	,010	20	,001		

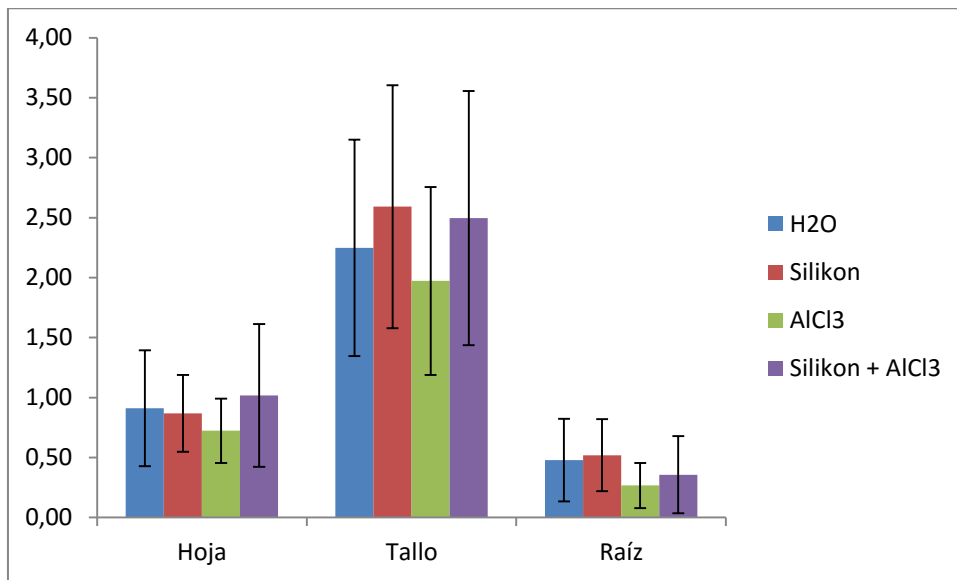


Fig 5: Peso fresco de las diferentes partes de las plantas de tomate tratadas con *Malvert-Silikon* en solución

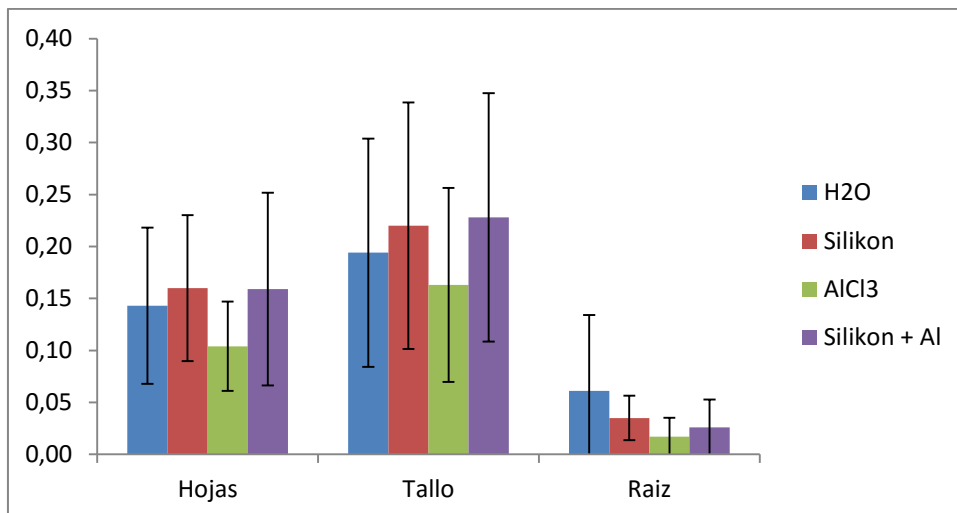


Fig 6de las diferentes partes de las plantas de tomate tratadas con *Malvert-Silikon* en solución

Podemos observar en los distintos gráficos que no hay variaciones significativas entre los pesos, tanto en fresco como en seco, de los órganos de las plantas ante los diferentes tratamientos.

Los p-valores de las ANOVAS son mayores a 0.05 por lo que no podemos decir que hay diferencias significativas entre los grupos. Esto puede verse en los gráficos ya que las desviaciones típicas son grandes.

Esto puede ser debido a la heterogeneidad del crecimiento de las, ya que las distintas réplicas se tomaron en dos tandas y por lo tanto hay valores diferentes entre los datos de las primeras 4 réplicas y las siguientes.

Una posible solución a ese problema podría ser aumentar el número de réplicas biológicas para que los tamaños de las plantas sean más homogéneos dentro de los grupos

Podemos ver en los gráficos que las plantas que se trataron en solución, que el AlCl_3 produce una disminución de los valores de peso de todos los órganos tanto en fresco como en seco.

Por otro lado, los valores de las plantas expuestas al AlCl_3 que fueron tratadas con *Manvert-Silikon* en solución aumentan con respecto a las que solamente se encuentran en contacto con AlCl_3 .

ii) Medida de la expresión génica por PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación.

La PCR a tiempo real nos permite conocer la cantidad de expresión de un gen en comparación a otro de expresión constitutiva, en este caso se tomó el gen de la tubulina.

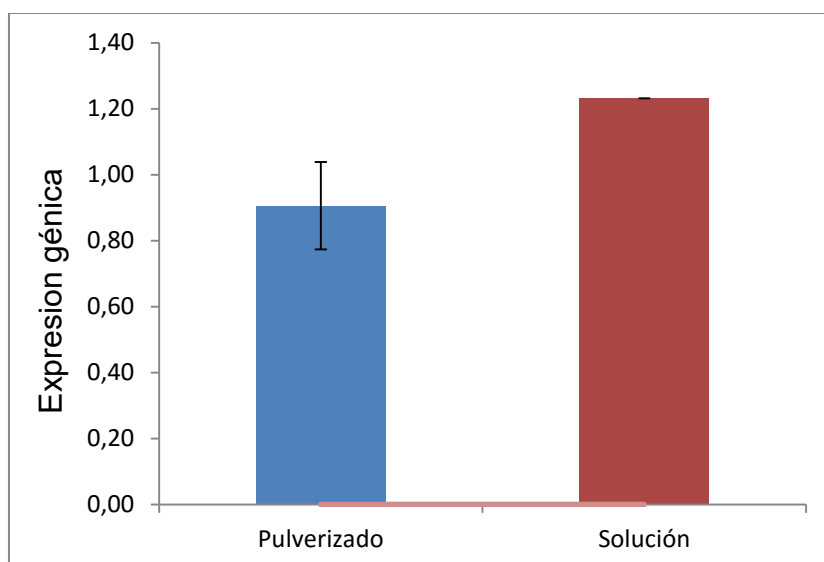


Fig 7 Representación gráfica de la expresión del gen en ambas maneras de aplicación del tratamiento

El gen LHA codifica para una H^+ - ATPasa que se expresa en las membranas citoplasmática de las raíces y posee funciones energéticas y reguladoras.

Esta ATPasa regula la salida de ácidos orgánicos del interior de las células al exterior en presencia de aluminio para neutralizar la toxicidad del aluminio.

Para saber cuánto se ha expresado este gen, recurrimos al método comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ porque la eficiencia de los cebadores para el gen de interés y para el de expresión constitutiva es idéntica. (Livak y Schmittgen, 2001)

Podemos observar en el gráfico como el tratamiento con *Manvert-Silikon* produce un aumento en la expresión del gen LHA en las plantas que fueron tratadas en solución y se expresa 1,2 veces más (Fig 7). Este resultado podría sugerir que el *Manvert-Silikon* tiene mayor eficacia si se aplica en el agua de riego,

De todas maneras el tratamiento no produce una expresión demasiado elevada del gen de interés pero tampoco podemos afirmar que la secreción de ácidos se reduzca o que la ATPasa tenga menor actividad.

Es posible que la poca expresión sea dada por el relativo poco tiempo de tratamiento ya que las plantas estuvieron en contacto con el *Manvert-Silikon* únicamente 24 horas.

Podría hacerse el mismo ensayo pero a con distintos tiempos de tratamiento y calcular cuánto se expresa en cada tiempo.

iii) Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR)

El análisis de componentes principales o PCA es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un gran conjunto de datos y poder ordenarlos por importancia. En nuestro caso se trata la ordenación de una gran cantidad de longitudes de onda de recibidas de las raíces de los distintos tratamientos.

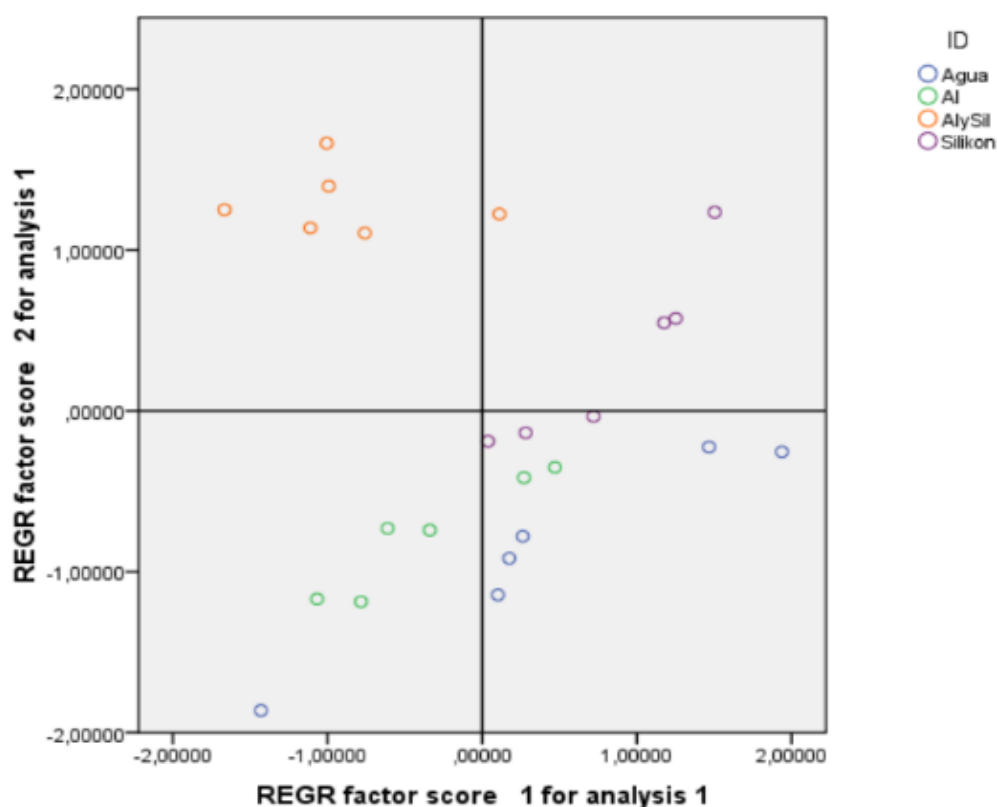


Fig 8 Representación gráfica de dos componentes del PCA

En el gráfico podemos ver como al representar los valores de dos primeros componentes para las distintas réplicas, mediante FTIR podemos diferenciar los distintos tratamientos.

Se puede observar claramente un grupo organizado y totalmente separado correspondiente al AlCl_3 + *Manvert-Silikon*

Esto nos sugiere que el AlCl_3 y el *Manvert-Silikon* provocan alteraciones en las paredes celulares de las raíces de los tomates del ensayo.

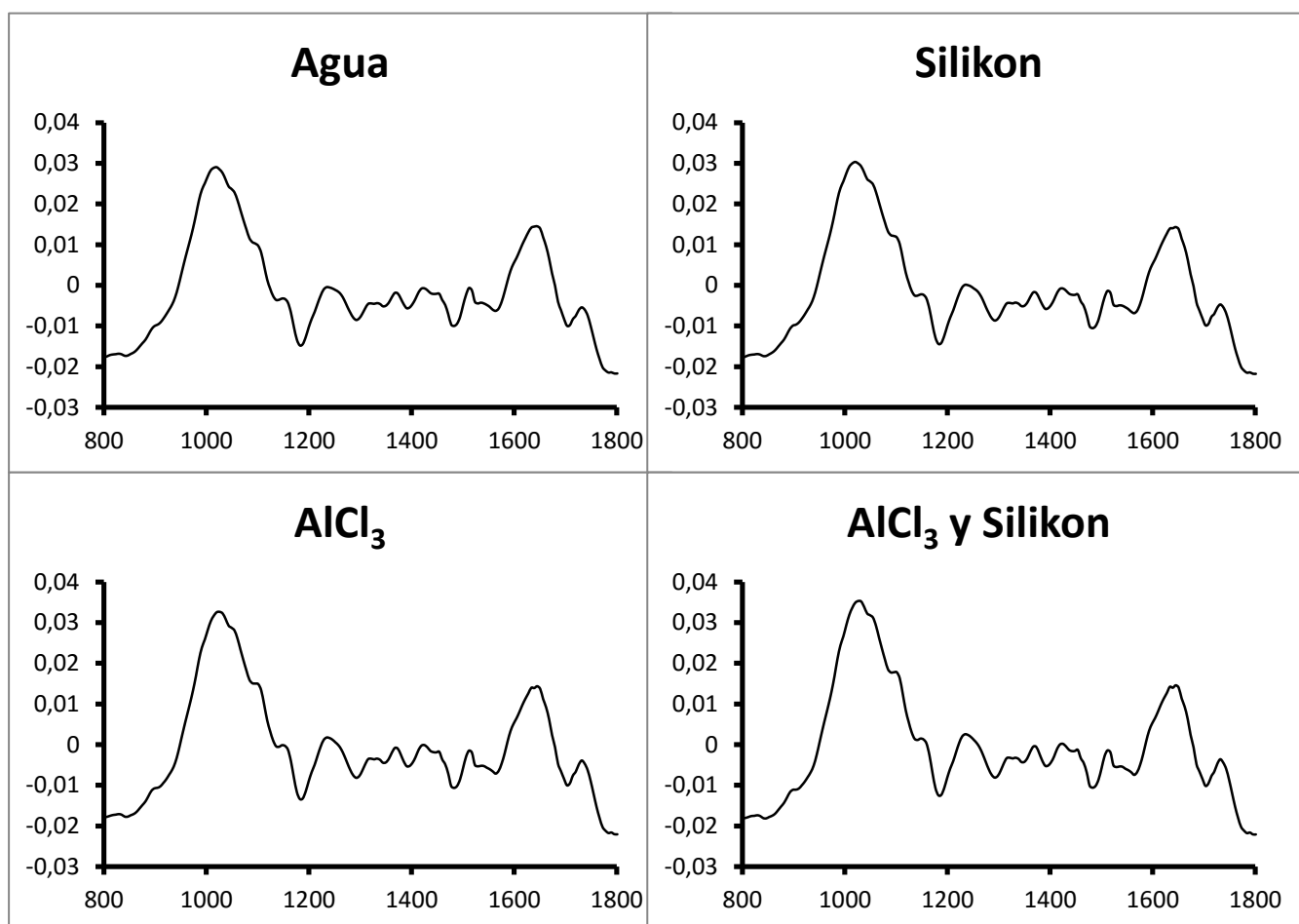


Fig 9 Representación gráfica de los espectros de FT-IR de cada una de las muestras de los distintos tratamientos aplicados

Esto nos sugiere que el AlCl_3 y el *Manvert-Silikon* provocan alteraciones en las paredes celulares de las raíces de los tomates del ensayo.

Cada espectro individual de cada muestra nos informa sobre la composición de las paredes celulares de las raíces.

El primer gráfico (superior izquierda) corresponde a plantas tratadas solo con agua por lo que representaría el control para comparar con el resto de situaciones.

Los principales picos obtenidos en los cuatro espectros (Fig9) aparecen en los mismos rangos de longitud de onda. Se produce un pico de absorbancia entorno a los 1650 nm que corresponde con anillos fenólicos propios de las ligninas (1500nm-1650nm) y un segundo pico a una longitud de onda aproximada de 1000 nm que corresponde con carbohidratos (800-1200) (Fernández-Pérez et al., 2014).

Estos resultados son los esperados dado que estos componentes son los que componen en su mayoría las paredes celulares vegetales de las raíces e indica que los tratamientos no provocan cambios radicales en la composición de la pared de las raíces.

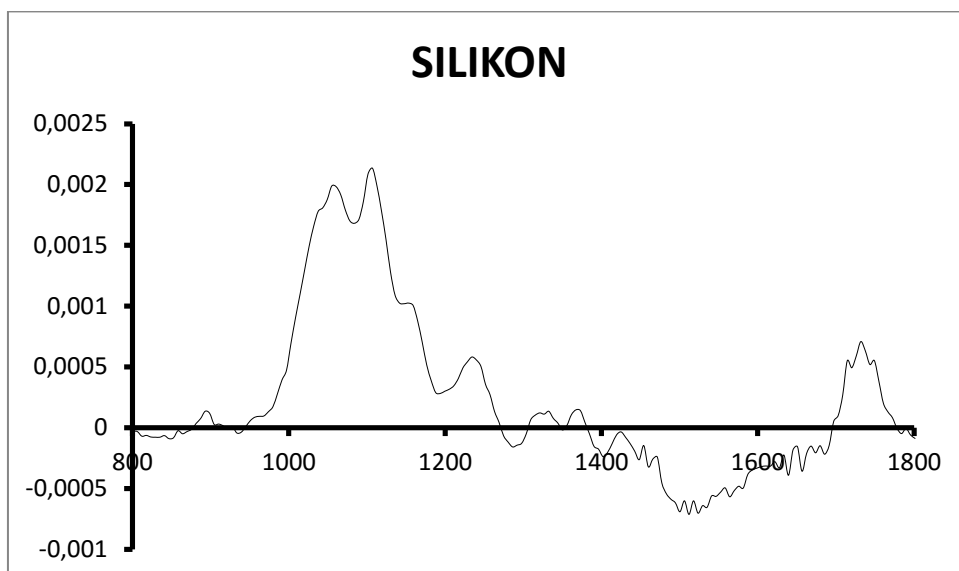


Fig 10 Representación gráfica del espectro obtenido tras la diferencia del espectro de las plantas tratadas con Silikon con el espectro de las tratadas con agua

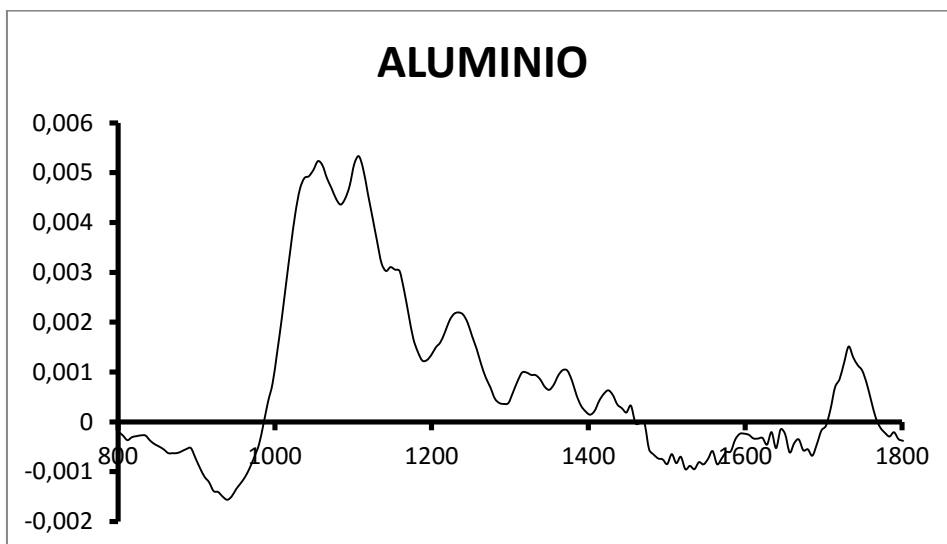


Fig 11 Representación gráfica del espectro obtenido tras la diferencia del espectro de las plantas tratadas con $AlCl_3$ con el espectro de las tratadas con agua

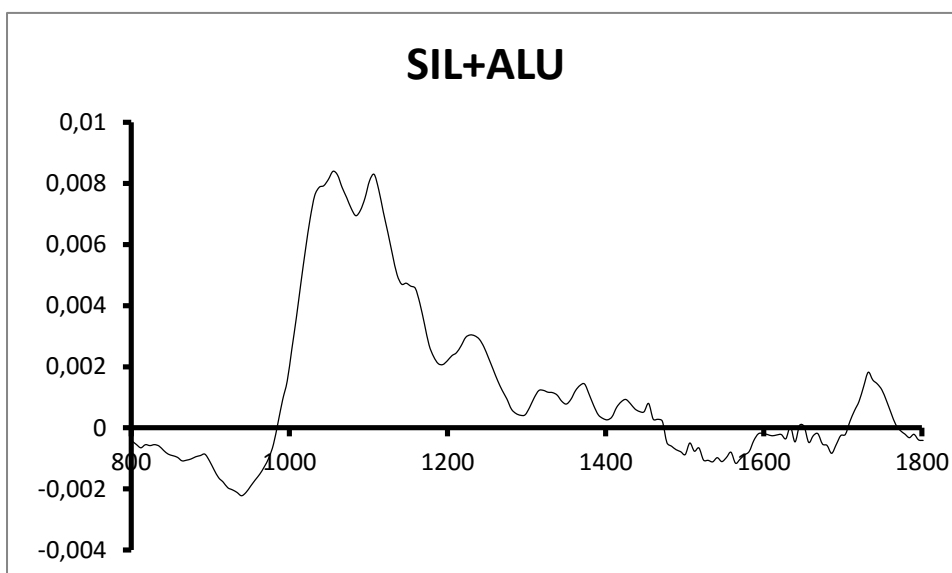


Fig 12 Representación gráfica del espectro obtenido tras la diferencia del espectro de las plantas tratadas con Silikon+ AlCl_3 con el espectro de las tratadas con agua

En las figuras se muestra la diferencia de los espectros a base de restar los espectros correspondientes a las plantas tratadas con *Manvert-Silikon* + H_2O , AlCl_3 + H_2O y *Manvert-Silikon* + AlCl_3 al espectro control (H_2O). De esta forma podemos observar cuales son aquellas variaciones producidas única y exclusivamente por los tratamientos.

En las plantas tratadas con *Manvert-Silikon* (Fig 10) podemos observar un pico en la región los carbohidratos (800 - 1200 nm). Esto corresponde con un aumento en la concentración de celulosa, hemicelulosa y pectinas en las paredes celulares de las raíces de las plantas tratadas con *Manvert-Silikon*; sin embargo, en comparación con el espectro correspondiente a las plantas que estuvieron en contacto con el AlCl_3 , la cantidad de carbohidratos no es ni la mitad de la producida por éstas (0.002 -0.005).

Por otro lado la cantidad de ligninas en las plantas tratadas con *Manvert-Silikon* parece disminuir con respecto al control mientras que las de las plantas tratadas con AlCl_3 y con *Manvert-Silikon* + AlCl_3 permanecen inalteradas ya que la región del espectro que corresponde con las ligninas está cercana al eje de abscisas. Lo normal es que en las plantas expuestas a un factor de estrés como es el aluminio debería aumentar sus proporciones de ligninas para formar paredes más gruesas y más inaccesibles a este compuesto (Luo, 1999).

Sin embargo, nuestros datos muestran un ligero descenso de la absorbancia de las muestras tratadas con *Manvert-Silikon*, AlCl_3 , y la combinación de ambos al compararlos con agua, entorno a los 1500 nm de longitud de onda, rango en el que absorben los anillos fenólicos de las ligninas

5. CONCLUSIONES CASTELLANO

- i) No se observan diferencias significativas entre los pesos de las muestras expuestas a diferentes tratamientos según las ANOVAS realizadas.
- ii) La expresión génica de LHA aumenta en presencia del tratamiento con Manvert-Silikon en solución para afirmar que sea debida únicamente al tratamiento
- iii) Según los datos obtenidos mediante la técnica de FT-IR si se observan cambios en las proporciones de las paredes celulares ante los distintos tratamientos testado.

CONCLUSIONS (ENGLISH)

- i) No significant differences between the exposed sample weights to different treatments according to ANOVA's performed were observed.
- ii) Gene expression LHA increase in Manvert-Silikon presence. However we can not affirm that this is only and exclusively because of the treatment and therefore the expression is not representative.
- iii) According to obtained data by FT-IR technique, other changes are observed in cell walls proportions under the different treatments.

6. BIBLIOGRAFIA

- Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental (2012). *Productos fitofortificantes*. <http://www.aefisa.es/productos/otros-medios-de-defensa-vegetal> (Última consulta 20/07/2016)
- Bioplaguicidas y fitofortificantes (2007). *Información técnica*. <http://docplayer.es/8283003-Bioplaguicidas-y-fitofortificantes-informacion-tecnica.htm> (última consulta 19/07/2016)
- Casierra, F. (2007). *Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección*. Revista Colombiana de ciencias hortícolas, vol 1, 246-257.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. y Randall, P.J. (1993) *Aluminum tolerance in wheat (Triticum aestivum L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices*. Plant Physiology 103, 695-702.
- Fernández-Pérez, F., Pomar, F., Pedreño, M.A. y Novo-Uzal, E. (2014) *The suppression of AtPrx52 affects fibers but not xylem lignification in Arabidopsis by altering the proportion of syringyl units*. Physiologia Plantarum, doi:10.1111/ppl.12310.
- Kopittke, P.M., Moore, K.L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B.J., Pax, F., Blamey, C., Menzies, N.W., Nicholson, T.M., McKenna, B.A., Wang, P., Gresshoff, P.M., Kourousias, G., Webb, R.I., Green, K. y Tollenaere, A. (2015). *Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots*. Plant Physiology 167, 1402-1411
- Ma, J.F. (2000). *Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants*. Plant Cell Physiol. 41(4), 383-390
- Wagatsuma, T., Kaneko, M. y Hayasaka, Y. (1987). *Destruction process of plant roots cells by aluminum*. Soil Science Plant Nutrition 33, 16-175
- Zheng, L., Lan, P., Shen, R.F. y Li, W.F. (2014). *Proteomics of aluminum tolerance in plants*. Proteomics 14, 566-578

Cristina Silvar Pereiro y Alba García Ulloa autorizan la defensa del presente Trabajo Fin de Grado realizado por Guillermo Pérez Fernández ante el tribunal calificador que le corresponda.

A Coruña, a 21 de Julio de 2016

Cristina Silvar Pereiro

Alba García Ulloa